

Attorney's Docket No. NAN.P110US

CERTIFICATE OF MAILING

Date of Deposit August 9, 2001

I hereby certify that this paper (along with any paper referred to as being attached or enclosed) is being deposited with the United States Postal Service "Express mail" on the date indicated above and is addressed to: Box Patent Applications, Assistant Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231

Michelle M. Kellhofer  
(Type or print name of Sender)

Michelle M. Kellhofer  
(Signature of Sender)

JC872 U.S. PTO  
09/927038  
08/09/01

#2  
MCJ

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re patent application

Applicant: Ito, et al. : Art Unit: -----

Serial No.: ----- : Examiner: -----

Filed: HEREWITH :

Title: METHOD FOR NEURITE OUTGROWTH

TRANSMITTAL OF CERTIFIED COPY

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

Dear Sir:

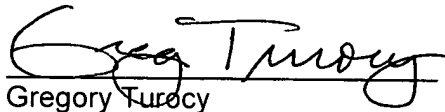
Attached please find a certified copy of the foreign application from which priority is claimed for this case.

Country: Japan  
Application No.: 2000-248021  
Filing Date: August 17, 2000

Attorney's Docket No. NAN.P110US

Respectfully submitted,

AMIN & TUROCY, L.L.P.

A handwritten signature in cursive script, appearing to read "Greg Turocy", written over a horizontal line.

Gregory Turocy  
Reg. No. 36,952

24<sup>TH</sup> Floor, National City Center  
1900 East 9<sup>th</sup> Street  
Cleveland, Ohio 44114  
Tel.: (216) 696-8730  
Facsimile: (216) 696-8731

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

Jc872 U.S. PTO  
09/927038  
08/09/01

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application: 2000年 8月17日

出 願 番 号

Application Number: 特願2000-248021

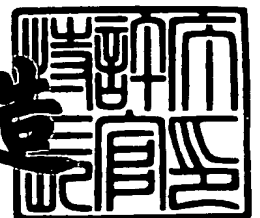
出 願 人

Applicant(s): 長瀬産業株式会社

2001年 7月 6日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3063544

【書類名】 特許願

【整理番号】 0054JP01

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K 31/35

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市西区室谷 2 丁目 2 番 3 号 長瀬産業株式会  
社研究開発センター内

【氏名】 伊藤 久富

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市西区室谷 2 丁目 2 番 3 号 長瀬産業株式会  
社研究開発センター内

【氏名】 田村 真也

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市西区室谷 2 丁目 2 番 3 号 長瀬産業株式会  
社研究開発センター内

【氏名】 宮崎 寿次

【特許出願人】

【識別番号】 000214272

【氏名又は名称】 長瀬産業株式会社

【代表者】 長瀬 洋

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 094283

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

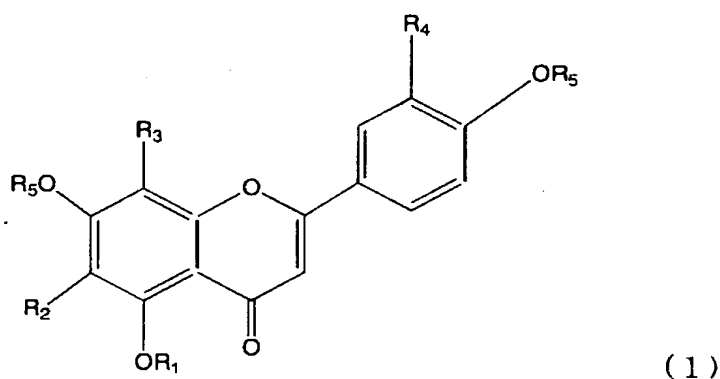
【発明の名称】 神経突起伸長剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記の一般式 (1) で表されるポリアルコキシフラボノイド

:

【化 1】



ここで、式中、 $R_1$  は、H または  $C_1 \sim C_6$  の低級アルキル基であり、 $R_2$ 、 $R_3$  および  $R_4$  は、各々独立して H または  $C_1 \sim C_6$  のアルコキシ基であり、そして  $R_5$  は、 $C_1 \sim C_6$  の低級アルキル基である；

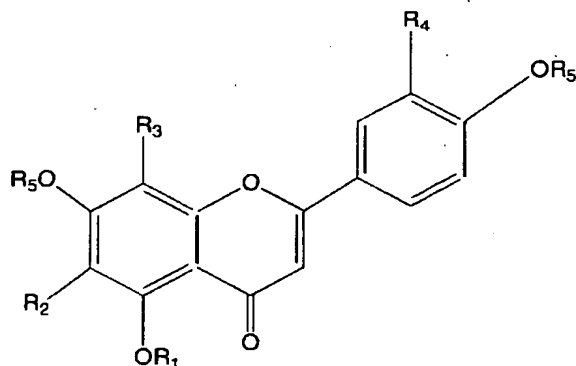
を含有する、神経突起伸長剤。

【請求項 2】 前記一般式 (1) で表されるポリアルコキシフラボノイドがノビレチンまたはタンゲレチンである、請求項 1 に記載の神経突起伸長剤。

【請求項 3】 ミカン科植物の抽出物を含有する、神経突起伸長剤。

【請求項 4】 前記ミカン科植物の抽出物が、下記一般式 (1) で表されるポリアルコキシフラボノイド：

【化 2】



(1)

ここで、式中、R<sub>1</sub>は、HまたはC<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>の低級アルキル基であり、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>およびR<sub>4</sub>は、各々独立してHまたはC<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>のアルコキシ基であり、そしてR<sub>5</sub>は、C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>の低級アルキル基である；

を含有する、請求項3に記載の神経突起伸長剤。

【請求項5】 前記一般式(1)で表されるポリアルコキシフラボノイドがノビレチンまたはタンゲレチンである、請求項4に記載の神経突起伸長剤。

【請求項6】 医薬品、医薬部外品または食品の形態に加工されている、請求項1から5のいずれかに記載の神経突起伸長剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は神経細胞に対して神経突起伸長作用を有する新規な神経突起伸長剤に関し、より詳細には、神経突起の伸長を促すことにより、アルツハイマー型痴呆症、脳虚血病態などの神経変性疾患の予防および／または改善、治療に有用な神経突起伸長剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

高齢化社会への移行に伴って老年型痴呆症が増加する傾向にある。これは非常に大きな社会問題となってきた。老年型痴呆症の原因となる疾患は数多く知られている。これらは、脳器質性障害による痴呆、脳以外の臓器疾患に付随した痴呆、およびストレスによる身体疾患に起因する痴呆に大別される。特に、その

原因の大半を占める脳器質性障害による痴呆は、原因の違いにより脳血管性痴呆症とアルツハイマー型痴呆症とに分類される。

【0003】

現在、脳血管性痴呆症に対しては、脳血管拡張薬などがある程度の効果を示すことが知られている。しかし、アルツハイマー型痴呆症に対しては、その発症原因が今なお不明であり、未だ発症を含めその進行を阻止するに適切な薬物療法も治療法も知られていない。そのため、脳器質性障害による痴呆、特にアルツハイマー型痴呆症に対して有用な医薬の開発が所望されている。

【0004】

近年は、神経細胞から分泌される神経成長因子 (NGF) などの神経栄養因子が神経変性疾患に対して優れた効果を示すことが見出され、注目を集めている。NGFは、神経組織の成長および機能維持にとって重要かつ必要な因子である。NGFは、末梢神経における知覚および交感神経の、ならびに中枢神経における大細胞性コリン作動性ニューロンの、成熟、分化、および生命維持に不可欠であり、脳損傷時の神経細胞の変性を防ぐという作用を示す。これにより、生体内においてNGFレベルを上昇させることは、アルツハイマー型痴呆症および脳血管性痴呆症のような中枢機能障害、脊髄損傷、末梢神経損傷、糖尿病性神経障害、ならびに筋萎縮変性側索硬化症のような抹消機能障害の治療に有用であると考えられている。

【0005】

しかし、NGFは、モノマーでは13000またはダイマーでは26000もの分子量を有するタンパク質であり、血液脳関門を通過することができない。そのため、例えば、中枢機能障害の治療を目的とした場合には、脳室内投与が必要となる。さらに、NGFの大量調製も困難である。このようにNGF自体の使用には多くの問題がある。結果として、一般に、NGF自体を臨床で用いることは非常に困難である。

【0006】

また、Y. Furukawaらはカテコールアミン (エピネフリン、ノルエピネフリン) を NGF 合成促進剤として使用することを開示している (FEB

S Lett., Vol. 208, 258 (1986))。一方、テアニン（特開平7-173059号公報）、エイコサペンタエン酸（EPA）、ドコサヘキサエン酸（DHA）（特開平8-143454号公報）がNGF合成促進剤として働くことも開示されている。

【0007】

しかし、エピネフリン、ノルエピネフリンはホルモン物質であるため、投与によって生体内におけるホルモンの量的バランスを崩すという問題がある。また、NGF合成促進剤には上記のホルモンまたはその他の化合物によって無理矢理にNGFを遊離させるため、ただでさえ、異常をきたしている脳細胞が疲弊するという欠点も考えられる。

【0008】

したがって、老年型痴呆症の予防および／または改善、治療のため、NGF様活性を示す低分子物質が有効であると考えられる。

【0009】

一方、特開2000-80035号公報は、ポリアルコキシフラボノイドがマトリックスメタロプロテアーゼ阻害作用を有していることを記載するのみである。また、特開平6-31627号公報は、薬用ニンジンのアルコール抽出物が神経細胞賦活作用を有していることを記載しているが、その賦活作用を奏する物質までは具体的に特定していない。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記問題の解決を課題とするものであり、その目的とするところは、副作用を伴うことなく、神経細胞に対して神経突起伸長作用を有する新規な神経突起伸長剤を提供することにある。

【0011】

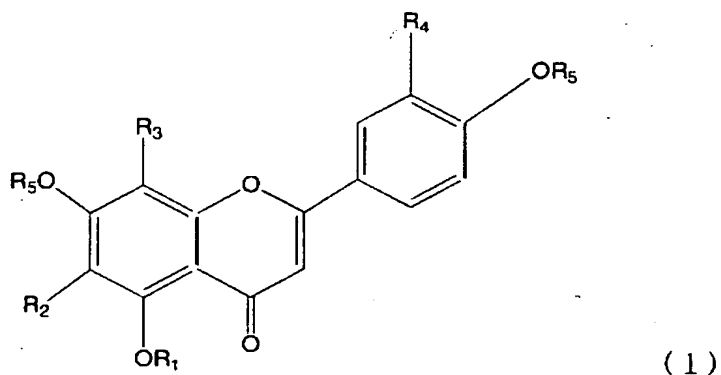
【課題を解決するための手段】

本発明は、下記の一般式（1）で表されるポリアルコキシフラボノイド：

【0012】



【化 3】



【0013】

ここで、式中、 $R_1$  は、Hまたは $C_1 \sim C_6$ の低級アルキル基であり、 $R_2$ 、 $R_3$  および $R_4$  は、各々独立してHまたは $C_1 \sim C_6$ のアルコキシ基であり、そして $R_5$  は、 $C_1 \sim C_6$ の低級アルキル基である；を含有する、神経突起伸長剤である。このことにより上記課題が解決される。

【0014】

好ましい実施形態においては、上記一般式(1)で表されるポリアルコキシフラボノイドはノビレチンまたはタンゲレチンである。

【0015】

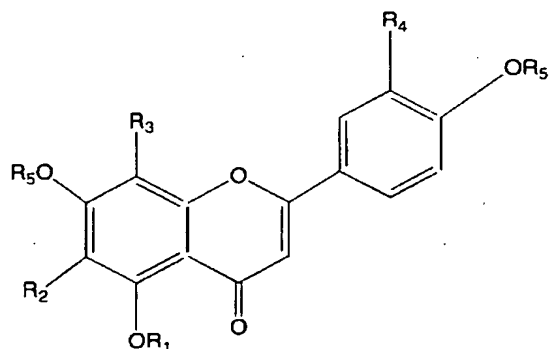
本発明はまた、ミカン科植物の抽出物を含有する、神経突起伸長剤である。

【0016】

好ましい実施形態においては、上記ミカン科植物の抽出物は、下記一般式(1)で表されるポリアルコキシフラボノイド：

【0017】

## 【化 4】



(1)

## 【0018】

ここで、式中、R<sub>1</sub>は、HまたはC<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>の低級アルキル基であり、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>およびR<sub>4</sub>は、各々独立してHまたはC<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>のアルコキシ基であり、そしてR<sub>5</sub>は、C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>の低級アルキル基である；を含有する。

## 【0019】

さらに好ましい実施形態においては、上記一般式(1)で表されるポリアルコキシフラボノイドはノビレチンまたはタンゲレチンである。

## 【0020】

好ましい実施形態においては、上記神経突起伸長剤は、医薬品、医薬部外品または食品の形態に加工されている。

## 【0021】

## 【発明の実施の形態】

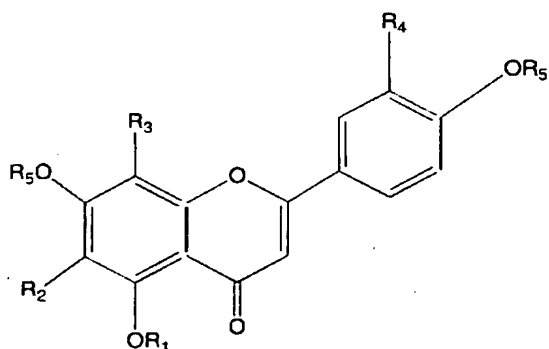
ラット副腎髄質褐色細胞腫由来のPC12細胞は、NGFに応答して神経突起を伸長することが知られている。本発明者らは、この評価系を用いて、NGF様活性を有する物質を種々検討した結果、特定の構造を有するポリアルコキシフラボノイドが優れた神経突起伸長作用を奏することを見出した。

## 【0022】

すなわち、本発明の神経突起伸長剤は、下記一般式(1)で表されるポリアルコキシフラボノイドを含有する：

## 【0023】

【化 5】



(1)

【0024】

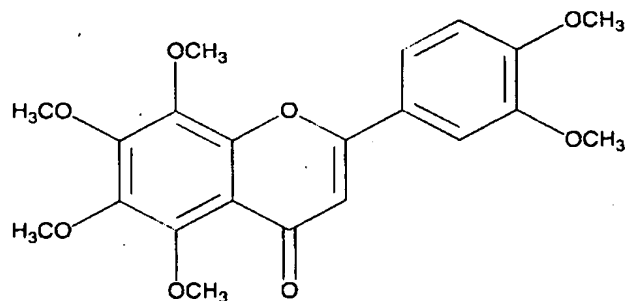
ここで、式中、 $R_1$  は、Hまたは $C_1 \sim C_6$ の低級アルキル基、好ましくはHまたは $C_1 \sim C_3$ の低級アルキル基であり、 $R_2$ 、 $R_3$  および  $R_4$  は、各々独立してHまたは $C_1 \sim C_6$ のアルコキシ基、好ましくはHまたは $C_1 \sim C_3$ のアルコキシ基であり、そして $R_5$  は、 $C_1 \sim C_6$ の低級アルキル基、好ましくは $C_1 \sim C_3$ の低級アルキル基である。

【0025】

本発明に用いられる一般式(1)で表されるポリアルコキシフラボノイドは、ミカン科植物に多く含まれていることや物質の安定性の点から、以下で表されるノビレチン(式(2)の化合物)およびタンゲレチン(式(3)の化合物)が好ましい。

【0026】

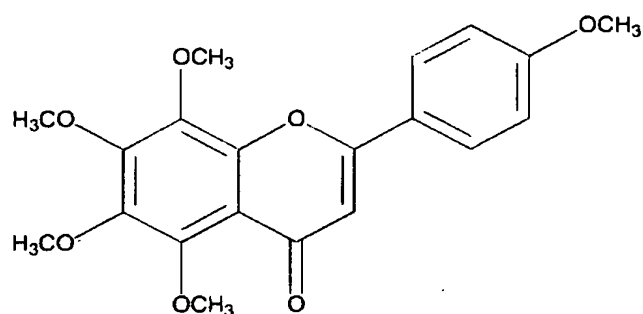
【化 6】



(2)

【0027】

## 【化 7】



(3)

## 【0028】

これらノビレチンおよびタンゲレチンはミカン科植物に多く含有されている。  
また、タンゲレチンは市販されているのでそのものを購入することもできる。

## 【0029】

本発明においては、一般式(1)で表されるポリアルコキシフラボノイドの含有量は、神経突起伸長剤中に有効成分として含有されるところ、神経突起伸長剤100重量%に対し、0.00001重量%～50重量%、好ましくは0.0001重量%～30重量%である。ポリアルコキシフラボノイドの含有量が0.00001重量%未満であれば、所望の神経突起伸長作用を達成することができない恐れがある。他方、その含有量が50重量%を超えても、この作用がそれ以上向上しない恐れがある。本発明においては、上記ポリアルコキシフラボノイドを複数混合して用いてもよい。

## 【0030】

本発明に用いられる一般式(1)で表されるポリアルコキシフラボノイドは当業者に周知の方法を用いて化学合成することができるが、後述するミカン科植物を用いて容易に抽出することができる。特にメトキシフラボノイドは Jie Chemらの方法(J. Agric. Food. Chem. 1997, 45, 364-368)に記載されているような方法で植物から抽出・単離してもよい。

## 【0031】

本発明の神経突起伸長剤はまた、ミカン科植物の抽出物を含有するものであってもよい。

## 【0032】

本発明に用いられるミカン科植物としては、Citrus属のヒラミレモン (Citrus depressa)、ウンシュウミカン (Citrus unshiu)、オオベニミカン (Citrus tangerina)、コベニミカン (Citrus erythrosa)、ダイダイ (Citrus aurantium)、ナツミカン (Citrus Natsudaikai)、ザボン (Citrus grandis)、ユズ (Citrus Junos)、ポンカン (Citrus rericulata)、レモン (Citrus limon)、カラタチ (Citrus trifoliata)、マルブシュカン (Citrus medica L.) などが挙げられる。これらの中でも特に、ヒラミレモン、ウンシュウミカンおよびダイダイが好ましい。本発明においては、上記ミカン科植物の抽出物を混合して用いてもよい。

## 【0033】

本発明に用いられるミカン科植物の抽出物は、採取後の生の状態または乾燥された状態のいずれの状態から抽出されたものであってもよい。部位としては、成熟したまたは未成熟の、果実、果皮、種子、葉、葉柄、枝、根、花などが挙げられる。特に、果実、果皮が好ましい。

## 【0034】

ミカン科植物抽出物は、例えば、以下のようにして得ることができる。

## 【0035】

まず、ミカン科植物の所定部位を抽出溶媒に浸漬する。抽出溶媒の量はミカン科植物が浸る量であればよいが、ミカン科植物の重量に対して2倍量から100倍量が好ましい。使用される抽出溶媒は特に限定されない。使用され得る抽出溶媒の例としては、メタノール、エタノール、n-プロパノール、イソプロパノール、t-ブタノールのような低級アルコール類、アセトン等のケトン類、および酢酸エチルエステル等のエステル類、エーテル類、クロロホルム、およびジクロロメタンのような有機溶媒ならびに水が挙げられる。これら抽出溶媒は単独または組合せて用いられる。本発明においては、メタノール、エタノール、酢酸エチルまたはこれら溶媒と水との組合わせが好ましく、毒性が低いという生体内にお

ける安全性を考慮すれば、エタノール、または水とエタノールとの混合溶媒がさらに好ましい。抽出温度などのその他抽出条件は特に限定されず、当業者により適切に設定され得る。

## 【0036】

このようにて得られたミカン科植物の抽出物は、上記一般式(1)で表されるポリアルコキシフラボノイド、好ましくは式(2)で表されるノビレチンおよび/または式(3)で表されるタンゲレチンを含有する。これらは、ミカン科植物の抽出物から、カラムクロマトグラフィーにより分離取得することができる。これにより得られた物質は、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ などの周知の手段によりノビレチンまたはタンゲレチンであると同定され得る。

## 【0037】

また、タンゲレチンは市販されているのでそのものを購入することもできる。

## 【0038】

一般式(1)で示されるフラボノイドの具体的代表例であるノビレチン、タンゲレチンをミカン科植物の当該化合物を含む抽出物によって代用する場合における当該抽出物の含有量は、上記と同様であるが、好ましくは神経突起伸長剤100重量%に対し、0.00001重量%~30重量%、より好ましくは0.0001重量%~15重量%である。抽出物乃至ノビレチン、タンゲレチンの含有量が0.00001重量%未満では、効果を十分発揮できない。

## 【0039】

本発明の神経突起伸長剤は、医薬品、医薬部外品または食品などに配合することができる。また、本発明の神経突起伸長剤は経口投与または非経口投与のいずれに使用されてもよい。

## 【0040】

医薬品の形態としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、シロップ剤などが挙げられる。これら医薬品は、通常の医薬製造における添加剤を使用して製造することができる。

## 【0041】

添加剤の具体例としては、ラクトース、デキストリン、スクロース、マンニト

ール、コーンスターチ、ソルビトール、結晶性セルロース、ポリビニルピロリドンなどが挙げられ、これらを単独または適宜組合わせて使用することができる。これら医薬品は、日本薬局方の記載に従い、各々の医薬品の形態に適した方法で製造することができる。また、香料、着色料、甘味料など適宜使用することもできる。これら添加剤の含有量は当業者に適切に選択され得る。

【 0 0 4 2 】

医薬部外品の形態としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、ゼリー剤、ドリンク剤などが挙げられる。これら医薬部外品は、通常の医薬部外品製造における添加剤を使用して製造することができる。さらに、これら医薬部外品は、例えばビタミン類などの他の有効成分を含有することもできる。また、甘味料、香料、着色料、酸化防止剤などの添加剤を単独または適宜組み合わせて使用することもできる。これら医薬部外品は、当業者に周知の方法で製造することができる。

【 0 0 4 3 】

食品の形態としては、麺、パスタ、顆粒、錠果、ゼリー、液体（飲料）などが挙げられる。これら食品は、様々な食品材料を適宜使用して製造することができる。食品材料の具体例は、米、小麦、トウモロコシ、ジャガイモ、スイートポテト、大豆粉、海藻粉、水飴、乳糖、グルコース、果糖、スクロース、マンニトールなどであり、これらを単独または適宜組み合わせて使用することができる。必要に応じて水などの使用により所望の形状にすることができる。さらに、香料、着色料、甘味料、食用油、ビタミン類などを適宜添加することもできる。

【 0 0 4 4 】

【実施例】

以下に本発明の実施例を示す。本発明は、これら実施例に何ら限定されるものではない。

【 0 0 4 5 】

<実施例 1>

セイヒ (Citrus unshiu の未熟果皮) の乾燥果皮 500 g を、常法により 90 (V/V) % エタノールで抽出し、濾過後減圧濃縮することにより、残渣 28.2 g を得た。さらに、これを酢酸エチル-水で分液し、酢酸エチル

層を減圧濃縮して、11.6gのセイヒ抽出物を得た。

【0046】

このセイヒ抽出物をシリカゲルクロマトグラフィー（溶離液；酢酸エチル：n-ヘキサン（1：1））にかけ、HPLC（溶離液：A. 2%酢酸水溶液、B. アセトニトリル、流速10mL/分、A：B=85%：15%で5分間溶離液を流した後、30分かけてA：B=85%：15% → A：B=40%：60%の濃度勾配となるように溶離液を流した。検出：UV 340nm）により分取を行なった。リテンションタイム28.5分と30.5分に得られた分画を濃縮乾固した後、ジエチルエーテルで結晶化して、結晶性の物質（1）および（2）を得た。常法により測定した物質（1）の融点は137℃～138℃であった。また、物質（1）の $^{13}\text{C}$ -NMRおよび $^1\text{H}$ -NMRの測定結果を表1に示す。

【0047】

【表1】

物質（1）のNMRスペクトル	
$^{13}\text{C}$ , $\delta$ (ppm)	$^1\text{H}$ , $\delta$ (ppm)
55.6 (OMe)、55.7 (OMe)、61.4 (OMe)、61.5 (OMe)、61.8 (OMe)、61.9 (OMe)、106.3 (CH)、108.9 (CH)、111.8 (CH)、114.3 (C)、119.3 (CH)、123.1 (C)、137.7 (C)、143.5 (C)、147.5 (C)、149.0 (C)、150.9 (C)、151.7 (C)、160.7 (C)、175.8 (C=O)	3.77 (s, 3H)、3.83 (s, 3H)、3.84 (s, 3H)、3.87 (s, 3H)、3.96 (s, 3H)、4.01 (s, 3H)、6.85 (s, 1H)、7.15 (d, J=8.6Hz, 1H)、7.53 (d, J=2.1Hz, 1H)、7.64 (dd, J=2.1, 8.6Hz, 1H)

【0048】

他方、常法により測定した物質（2）の融点は、156℃～157℃であった。また、物質Bの $^{13}\text{C}$ -NMRおよび $^1\text{H}$ -NMRの測定結果を表2に示す。

【0049】



【表 2】

物質 (2) のNMRスペクトル	
$^{13}\text{C}$ , $\delta$ (ppm)	$^1\text{H}$ , $\delta$ (ppm)
55.5 (OMe)、61.6 (OMe)、61.8 (OMe)、62.0 (OMe)、62.2 (OMe)、106.7 (CH)、114.5 (CHx2)、114.9 (C)、123.8 (C)、127.7 (CHx2)、138.1 (C)、144.1 (C)、147.7 (C)、148.4 (C)、151.3 (C)、161.2 (C)、162.3 (C)、176.8 (C=O)	3.88 (s, 3H)、3.94 (s, 3H)、4.02 (s, 3H)、4.09 (s, 3H)、6.59 (s, 1H)、7.01 (d, J=8.8Hz, 2H)、7.86 (d, J=8.8Hz, 2H)

## 【0050】

これら物質 (1) および (2) の測定値を文献 (J. Agric. Food. Chem. 1997, 45, 364-368) に記載の数値と比較して、得られた物質 (1) がノビレチンであり、かつ物質 (2) がタンゲレチンであることを確認した。

## 【0051】

確認後、このようにして得られた抽出物を試験物質 A (神経突起伸長剤) としてそのまま使用した。

## 【0052】

次いで、ラット副腎髄質褐色細胞腫由来の細胞株 PC12 細胞を、トランスフェリン  $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 、インスリン  $5\mu\text{g}/\text{ml}$  およびプロゲステロン  $20\text{nM}$  の割合で含有する無血清 DMEM/F12 培地 (GIBCO 社、以後 DMEM-TIP 培地と省略する。) に、 $2.0 \times 10^4$  セル/穴 (平底 24 ウェルコラーゲンコートプレート、IWAKI 社製) となるように播種し、 $37^\circ\text{C}$ 、5%の  $\text{O}_2$  条件下で一晩培養した。

## 【0053】

その後、上記 PC12 細胞を、培地から除去しそして  $10\mu\text{g}/\text{ml}$  の上記試験物質 A を含有する DMEM-TIP 培地に移して、さらに 3 日間培養を行った。

【0054】

3日間の培養後、プレートの各穴について細胞を200倍の倍率で顕微鏡観察し、総数200以上の細胞のうち、神経突起が伸びている細胞（細胞の直径よりも長い突起を出している細胞）の割合を百分率で算出した。結果を表3に示す。

【0055】

<実施例2>

PC12細胞を、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ の試験物質Aを含有するDEMEM-TIP培地に移したこと以外は、実施例1と同様にして神経突起が伸びている細胞の割合を算出した。結果を表3に示す。

【0056】

<実施例3>

ヒラミレモン (*Citrus depressa*) の乾燥果皮500gを、常法により90 (V/V) %エタノールで抽出し、濾過後減圧濃縮することにより、19.6gの残渣を得た。次いで、これを酢酸エチル-水で分液し、酢酸エチル層を減圧濃縮して、8.5gのヒラミレモン抽出物を得た。

【0057】

このヒラミレモン抽出物について、HPLC（溶離液：A. 2%酢酸水溶液、B. アセトニトリル、流速 $1\text{mL}/\text{分}$ 、A : B = 85% : 15%で5分間溶離液を流した後、30分かけてA : B = 85% : 15% → A : B = 40% : 60%の濃度勾配となるように溶離液を流した。検出：UV 340nm）にて分析したところ、ノビレチン（リテンションタイム：28.2分）およびタンゲレチン（リテンションタイム：30.5分）に相当するピークが認められた。

【0058】

試験物質Aの代りに、このヒラミレモン抽出物を試験物質Bとしてそのまま使用し、そしてPC12細胞を、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ の試験物質Bを含有するDEMEM-TIP培地に移したこと以外は、実施例1と同様にして神経突起が伸びている細胞の割合を算出した。結果を表3に示す。

【0059】

<実施例4>

PC12細胞を、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ の試験物質Bを含有するDEMEM-TIP培地に移したこと以外は、実施例3と同様にして神経突起が伸びている細胞の割合を算出した。結果を表3に示す。

【0060】

<実施例5>

トウヒ (*Citrus aurantium*) 乾燥果皮500gを、常法により90 (V/V) %エタノールで抽出し、濾過後減圧濃縮することにより、18.5gの残渣を得た。次いで、これを酢酸エチルー水で分液し、酢酸エチル層を減圧濃縮して、7.2gのトウヒ抽出物を得た。

【0061】

このトウヒ抽出物について、HPLC (溶離液: A. 2%酢酸水溶液、B. アセトニトリル、流速 $1\text{mL}/\text{分}$ 、A:B=85%:15%で5分間溶離液を流した後、30分かけてA:B=85%:15% → A:B=40%:60%の濃度勾配となるように溶離液を流した。検出: UV 340nm) にて分析したところ、ノビレチン (リテンションタイム: 28.2分) およびタンゲレチン (リテンションタイム: 30.5分) に相当するピークが認められた。

【0062】

試験物質Aの代りに、このトウヒ抽出物を試験物質Cとしてそのまま使用し、そしてPC12細胞を、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ の試験物質Cを含有するDEMEM-TIP培地に移したこと以外は、実施例1と同様にして神経突起が伸びている細胞の割合を算出した。結果を表3に示す。

【0063】

<実施例6>

PC12細胞を、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ の試験物質Cを含有するDEMEM-TIP培地に移したこと以外は、実施例5と同様にして神経突起が伸びている細胞の割合を算出した。結果を表3に示す。

【0064】

<実施例7>

試験物質Aの代りに、実施例1で得られたノビレチンを試験物質Dとしてその

まま使用し、そしてPC12細胞を、10  $\mu$ Mの試験物質Dを含有するDEME  
M-TIP培地に移したこと以外は、実施例1と同様にして神経突起が伸びてい  
る細胞の割合を算出した。結果を表3に示す。

【0065】

<実施例8>

試験物質Aの代りに、実施例1で得られたノビレチンを試験物質Dとしてその  
まま使用し、そしてPC12細胞を、50  $\mu$ Mの試験物質Dを含有するDEME  
M-TIP培地に移したこと以外は、実施例1と同様にして神経突起が伸びてい  
る細胞の割合を算出した。結果を表3に示す。

【0066】

<実施例9>

試験物質Aの代りに、実施例1で得られたノビレチンを試験物質Dとしてその  
まま使用し、そしてPC12細胞を、100  $\mu$ Mの試験物質Dを含有するDEM  
EM-TIP培地に移したこと以外は、実施例1と同様にして神経突起が伸びて  
いる細胞の割合を算出した。結果を表3に示す。

【0067】

<実施例10>

試験物質Aの代りに、実施例1で得られたタンゲレチンを試験物質Eとしてそ  
のまま使用し、そしてPC12細胞を、10  $\mu$ Mの試験物質Eを含有するDEM  
EM-TIP培地に移したこと以外は、実施例1と同様にして神経突起が伸びて  
いる細胞の割合を算出した。結果を表3に示す。

【0068】

<実施例11>

試験物質Aの代りに、実施例1で得られたタンゲレチンを試験物質Eとしてそ  
のまま使用し、そしてPC12細胞を、100  $\mu$ Mの試験物質Eを含有するDE  
MEM-TIP培地に移したこと以外は、実施例1と同様にして神経突起が伸び  
ている細胞の割合を算出した。結果を表3に示す。

【0069】

<比較例1>

PC12細胞を、実施例1の試験物質Aを含有しないDEMEM-TIP培地に移したことを以外は、実施例1と同様にして神経突起が伸びている細胞の割合を算出した。この場合をコントロールとした。結果を表3に示す。

【0070】

<比較例2>

試験物質Aの代りに、神経突起伸長作用を有することが報告されているジブチルサイクリックAMP (Nerochem. Int. 33, 503, 1999) を試験物質Fとしてそのまま使用し、そしてPC12細胞を、100  $\mu$ Mの試験物質Fを含有するDEMEM-TIP培地に移したことを以外は、実施例1と同様にして神経突起が伸びている細胞の割合を算出した。結果を表3に示す。

【0071】

<比較例3>

試験物質Aの代りに、神経突起伸長作用を有することが報告されているイソブチルメチルキサンチン (J. Neurobiol. 19 (8), 681, 1988) を試験物質Gとしてそのまま使用し、そしてPC12細胞を、100  $\mu$ Mの試験物質Gを含有するDEMEM-TIP培地に移したことを以外は、実施例1と同様にして神経突起が伸びている細胞の割合を算出した。結果を表3に示す。

【0072】

【表 3】

	試験物質中の有効成分	培地中の本発明の神経突起伸長剤の濃度	神経突起が伸長した細胞の割合 (%)	コントロール (比較例 1) に対する伸長した細胞の割合の相対値 <sup>1)</sup>
実施例 1	セイヒ抽出物	10 $\mu\text{g/mL}$	10.2	2.9
実施例 2	セイヒ抽出物	50 $\mu\text{g/mL}$	18.6	5.3
実施例 3	ヒラミレモン抽出物	10 $\mu\text{g/mL}$	7.5	2.1
実施例 4	ヒラミレモン抽出物	50 $\mu\text{g/mL}$	16.8	4.8
実施例 5	トウヒ抽出物	10 $\mu\text{g/mL}$	7.1	2.0
実施例 6	トウヒ抽出物	50 $\mu\text{g/mL}$	15.9	4.5
実施例 7	ノビレチン	10 $\mu\text{M}$	8.7	2.5
実施例 8	ノビレチン	50 $\mu\text{M}$	16.6	4.7
実施例 9	ノビレチン	100 $\mu\text{M}$	42.8	12.2
実施例 10	タンゲレチン	10 $\mu\text{M}$	4.8	1.4
実施例 11	タンゲレチン	100 $\mu\text{M}$	12.2	3.5
比較例 1	なし (コントロール)	—	3.5	1.0
比較例 2	ジブチルサイクリック AMP	100 $\mu\text{M}$	11.6	3.3
比較例 3	イソブチルメチルキサンチン	100 $\mu\text{M}$	11.8	3.4

1) 相対値は、「伸長した細胞の割合値」をコントロール (比較例 1) 値で除して表す。

## 【0073】

表 3 に示されるように、比較例 1 のコントロールと比較して、実施例 1 ～ 11 で得られた試験物質 A ～ G は、いずれも細胞に対して優れた神経突起の伸長作用を有する。また、実施例 1 ～ 11 の結果によれば、細胞に対して添加される試験物質の濃度が高いほど、神経突起伸長作用も大きい。このことから、実施例 1 ～ 11 で得られた試験物質 A ～ G はいずれも優れた神経突起伸長剤として有用であることがわかる。

## 【0074】

## ＜実施例 12：食品の製造＞

実施例 1 で得た試験物質 A (セイヒ抽出物) を用いて、以下の組成を有する食品を調製した。

## 【0075】

【表 4】

成分	重量 (k g)
セイヒ抽出物	2. 0
大豆サポニン	2. 0
黒酢エキス	2. 0
リンゴファイバー	2. 0
レシチン	1. 0
フラクトオリゴ糖	2. 0
果糖	1. 0
粉末酢	0. 1
シクロデキストリン	1. 0
蜂蜜	1. 0
骨粉	1. 0
デキストリン	4. 9

【0 0 7 6】

各成分を流動造粒機中で混合した後、水を噴霧して造粒を行ない、入風温度 8 0℃で乾燥した。

【0 0 7 7】

＜実施例 1 3：硬ゼラチンカプセルの製造＞

実施例 3 で得られた試験物質 C（ヒラミレモン抽出物）を用いて以下の硬ゼラチンカプセルを調製した。

【0 0 7 8】

【表 5】

成分	量 (m g / カプセル)
ヒラミレモン抽出物	2 5 0
デンプン	1 0 0
セルロース	1 0 0
ステアリン酸マグネシウム	1 0
合計	4 6 0 m g

【0 0 7 9】

＜実施例 1 4：錠剤の製造＞

実施例 7 に記載の試験物質 D（ノビレチン）を用いて以下の錠剤を調製した。

【0 0 8 0】

【表 6】

成分	量 (mg /錠剤)
ノビレチン	2 5 0
セルロース	4 0 0
二酸化ケイ素	1 0
ステアリン酸	5
合計	6 6 5mg

【 0 0 8 1】

## 【発明の効果】

本発明によれば、細胞に対して、安全性が高くかつ優れた神経突起伸長作用を提供することができる。特に、ポリアルコキシフラボノイドであるノビレチンまたはタンゲレチンを有効成分として含有させることが有用である。本発明の神経突起伸長剤は、医薬品、医薬部外品または食品組成物として使用することができる、アルツハイマー型痴呆症、脳虚血病態などの神経変性疾患の予防および／または治療に有用である。



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 副作用を伴うことなく、神経細胞に対して神経突起伸長作用を有する新規な神経突起伸長剤を提供すること。

【解決手段】 特定の構造を有するポリアルコキシフラボノイド、特にノビレチンおよびタンゲレチンが神経突起伸長作用を有することを見出した。また、これらを含むミカン科の植物抽出物についても、神経突起伸長作用を有することを見出した。

【選択図】 なし

特 2000-248021

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2000-248021
受付番号	50001046924
書類名	特許願
担当官	小菅 博 2143
作成日	平成12年 8月21日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成12年 8月17日
-------	-------------

次頁無

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000214272]

1. 変更年月日 1990年 8月30日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市西区新町1丁目1番17号

氏 名 長瀬産業株式会社